

Compositions for the prevention of skin aging contain a mixture of extracts of pine and blackcurrant

Patent number: FR2792203
Publication date: 2000-10-20
Inventor: AMOUROUX PIERRE; CHANTERANNE BRIGITTE
Applicant: MU LABORATOIRE (FR)
Classification:
- international: A61K35/78; A61K7/48; A61P17/06; A61P17/00;
A61P37/08; A61P9/14
- european: A61K8/97; A61K35/78; A61Q19/08
Application number: FR19990004910 19990419
Priority number(s): FR19990004910 19990419

Report a data error here

Abstract of FR2792203

Compositions containing a mixture of extracts of pine and blackcurrant. The extract is preferably made from pine bark and blackcurrant leaves, these being extracted using ethanol to give a clear orange-brown liquid of pH 4.5-5.5 and a density of 0.95-1.05 at 20 deg C. The weight ratio of pine bark to blackcurrant leaves is preferably in the range 60-40 to 90-10, with 75-25 being especially preferred.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 792 203**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **99 04910**

⑤① Int Cl⁷ : A 61 K 35/78, A 61 K 7/48, A 61 P 17/06, 17/00, 37/08,
9/14

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 19.04.99.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 20.10.00 Bulletin 00/42.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : MU LABORATOIRE Société anonyme
— FR.

⑦② Inventeur(s) : AMOUROUX PIERRE et CHANTE-
RANNE BRIGITTE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-
CHY SARL.

⑤④ NOUVELLE COMPOSITION A BASE D'EXTRAITS VEGETAUX NATURELS, ET SON UTILISATION,
NOTAMMENT DANS LES DOMAINES PHARMACEUTIQUES OU COSMETIQUES.

⑤⑦ La présente invention a pour objet des compositions
comprenant un mélange d'extraits de Pin et de Cassis, leur
procédé d'obtention et leur utilisation dans des composi-
tions cosmétiques ou pharmaceutiques, destinées notam-
ment à la prévention ou au traitement des manifestations du
vieillessement de la peau.

FR 2 792 203 - A1



Nouvelle composition à base d'extraits végétaux naturels, et son utilisation, notamment dans les domaines pharmaceutiques ou cosmétiques.

La présente invention se rapporte à une nouvelle composition à base d'extraits
5 végétaux naturels, et son utilisation, notamment dans les domaines pharmaceutiques ou cosmétiques, notamment comme agent anti-âge.

La quête de l'éternelle jeunesse, un des mythes les plus anciens de l'humanité, est plus que jamais d'actualité. Hommes et femmes cherchent à conserver le plus longtemps possible une apparence de jeunesse. Pour ce faire, il
10 est indispensable de prévenir, retarder ou réparer les manifestations du vieillissement.

Les premiers signes de sénescence apparaissent au niveau cutané. En effet, le vieillissement se traduit d'abord par des changements apparents qui frappent le tissu conjonctif, notamment le derme de la peau et ses annexes. Les rides en sont le
15 premier signe. Puis la peau devient fine, les vaisseaux sous-cutanés deviennent visibles par transparence.

La cellule principale du tissu conjonctif est le fibroblaste. Sa fonction principale est de synthétiser deux molécules fondamentales et très sensibles aux mécanismes du vieillissement : le collagène et l'élastine.

20 La composition du collagène se modifie avec l'âge, certaines de ses molécules d'acides aminés se raréfient (hydroxyllysine), certaines de ses enzymes baissent d'activité (propyl- et lysyl-hydroxylases notamment). L'élastine se dégrade; ses fibres se désorganisent, leurs limites s'estompent, leur structure s'effiloche.

Rester jeune c'est donc essentiellement protéger sa peau des agressions
25 extérieures.

La peau constitue une membrane de couverture, de soutien et de protection s'opposant, dans une certaine mesure, à l'action des agents physiques, chimiques et bactériologiques du monde environnant. Par ses propriétés sélectives d'imperméabilité et de perméabilité, la peau empêche la pénétration de certains
30 corps chimiques étrangers, alors qu'elle permet le passage d'autres éléments (rejet ou absorption).

La peau est formée de deux types de tissus, l'un superficiel, l'épiderme, de nature épithéliale, l'autre, sous-jacent, le derme, de nature conjonctive.

Le derme est surtout formé de faisceaux de fibres de collagènes, disposées en bandes onduleuses, allongées en tous sens et entrecroisées. Ces fibres sont constituées de fibrilles. Cette charpente du derme comprend, en outre, de minces fibres élastiques sinueuses et de grêles fibres réticuliniques dessinant un réseau très fin.

Le derme est de surcroît le siège de réactions biochimiques permettant les échanges entre le sang, la peau, la matrice extracellulaire et le milieu extérieur. Ces processus métaboliques s'accomplissent essentiellement au sein de la «substance fondamentale», constituée par un gel colloïdal, et ils dépendent surtout des mucopolysaccharides tels que l'acide hyaluronique, l'acide chondroïtine-sulfurique et l'acide mucoïtine-sulfurique. Ces mucopolysaccharides sont, à l'état normal, fortement polymérisés afin de donner à la substance fondamentale son état visqueux. Cette viscosité assure la cohésion du système fibrillaire et contribue à former une barrière contre les infections.

La dépolymérisation des mucopolysaccharides se fait sous l'influence d'enzymes, notamment des hyaluronidases; rendant la substance fondamentale plus fluide. Dans le cadre d'un processus physiologique normal, le degré de polymérisation varie pour faciliter les échanges. Mais il existe des cas pathologiques où les hyaluronidases sécrétées par certains germes rendent la substance fondamentale trop fluide, facilitant ainsi la diffusion des processus infectieux.

On sait que l'acide hyaluronique régit, en grande partie, l'hydratation du derme.

Par ailleurs, au sein de la matrice extra-cellulaire cutanée, certaines macromolécules composées de sucres et de protéines ont une structure spatiale naturellement organisée en réseau maillé du fait de liaisons par glycosylation enzymatique. Certaines enzymes présentes au niveau de cette matrice la dégradent afin de faciliter sa reconstruction. Il existe un certain équilibre entre les facteurs favorisant la synthèse de cette matrice par les fibroblastes et les facteurs favorisant la production d'enzymes qui dégradent les éléments matriciels. Au cours du vieillissement, les phénomènes de dégradation sont plus rapides que la synthèse et certains éléments de soutien, comme les fibres d'élastine, de collagène et les protéoglycanes ont tendance à disparaître.

Jusqu'ici, l'extrait de Pin était connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, anti-allergéniques, et surtout pour ses propriétés anti-oxydantes décrites notamment dans le brevet américain 5 470 874.

5 L'extrait de Cassis était surtout connu pour son rôle dans les problèmes vasculaires, relatifs notamment à la vision, et pour son action contre l'ischémie telle que décrite dans la demande internationale WO9851291.

Le Cassissier (*Ribes nigrum*), appartenant à la famille des Saxifragacées, est un arbrisseau indigène dont les feuilles et les bourgeons sont employés en médecine populaire. Spontané dans l'est de la France, il est souvent cultivé dans les autres
10 régions pour ses fruits : de petites baies noires.

Les feuilles, outre des traces d'huile essentielle riche en cymène, renferment de nombreux flavonoïdes, prodelphinidols dimères et trimères qui contribuent à l'activité anti-âge de la composition de l'invention.

Les Pins, de la famille des Pinacées, presque tous localisés dans l'hémisphère
15 nord, sont très connus pour leur production, dans des canaux sécréteurs, de térébenthine. La térébenthine et son essence sont de puissants modificateurs des sécrétions trachéo-bronchiques par leur action fluidifiante, expectorante et antiseptique. Mais ces conifères sont aussi réputés pour leur huile essentielle riche en pinène, utilisée en parfumerie.

20 On peut citer, à titre d'exemple, le pin sylvestre (*Pinus silvestris*), le pin noir ou le pin d'Autriche (*Pinus austriaca*), indigènes en France, mais aussi, le pin maritime (*Pinus maritima*), originaire des pays méditerranéens, etc.

Le pin préféré utilisé dans la composition de l'invention est le Pin sylvestre, souvent renommé Pin d'Auvergne ou Pin d'Ecosse. Les flavonoïdes et les acides
25 organiques qu'il renferme, notamment au niveau de l'écorce où la concentration est plus importante, contribuent à l'activité "anti-âge" de la composition de l'invention.

Deux groupes de tanins sont habituellement identifiés chez les végétaux supérieurs :

- les tanins hydrolysables, dérivés de l'acide gallique et l'acide ellagique,
- 30 - les tanins condensés, dérivés des catéchines, qui renferment la classe d'actifs constituée par les oligomères proanthocyanidoliques, encore appelés les OPC.

La plupart des OPC ont une capacité de complexation avec différents radicaux libres, ce qui a pour effet de stabiliser ces radicaux libres et donc de les rendre moins nocifs pour l'organisme.

Dans la plupart des molécules organiques, les atomes voisins sont liés les uns aux autres par des liaisons covalentes, c'est-à-dire fondées sur l'appariement naturel des électrons de vecteur magnétique ou «spin» opposé. Lors d'une irradiation, de l'exposition à une source d'énergie lumineuse ou thermique d'intensité suffisante, ou de réactions chimiques d'oxydoréduction, le couple électronique peut être rompu. La molécule ou l'atome se trouve de ce fait porter un ou plusieurs électrons «célibataires» sur son orbitale externe et est désigné sous le terme de «radical libre». La tendance naturelle des électrons non appariés à interagir avec les électrons de molécules ou d'atomes voisins, pour reformer des liaisons chimiques covalentes, confère aux radicaux libres une très grande instabilité, une extrême réactivité et la capacité de déclencher la néoformation et la propagation en chaîne d'autres espèces radicalaires. C'est ce processus de transfert et de propagation des radicaux libres que l'on désigne parfois sous le terme évocateur de «cascade radicalaire», et qui, au sein de la matière vivante, peut aboutir à la destruction partielle ou complète des structures cellulaires et tissulaires avoisinantes.

En fait, une partie des radicaux libres sont produits selon un processus physiologique normal au cours des réactions métaboliques de la cellule : respiration mitochondriale, phagocytose, détoxification, etc. Mais les polluants comme les hydrocarbures polycycliques du tabac, les rayonnements solaires ou les inflammations, favorisent l'apparition excessive de radicaux libres.

Parmi ces radicaux libres on distingue les radicaux oxygénés libres dont la participation dans le processus naturel du vieillissement est aujourd'hui considérée comme très vraisemblable.

De plus, une exposition prolongée au soleil altère la structure cutanée. Les rayons ultraviolets du soleil interfère avec les lipides de la peau et produit par peroxydation des radicaux libres qui endommagent le film cutané superficiel, mi-aqueux, mi-gras, qui recouvre tout l'épiderme. La composition de l'invention neutralise les radicaux libres, protégeant ainsi ce film hydrolipidique de surface. Or ce film hydrolipidique de surface intervient contre les excès d'humidification et de dessiccation; il s'oppose aux changements brusques de température et contribue, en outre, à maintenir l'acidité de la surface de la peau dont le pH oscille entre 4,2 et 5,6 suivant les régions; cette acidité étant un facteur important de défense contre les microbes.

Le vieillissement cutané est un phénomène complexe lié notamment à la transformation des tissus conjonctifs et à la diminution de la capacité de renouvellement de leurs cellules. Au cours du vieillissement, les tissus perdent leur élasticité, augmentent leur extensibilité et perdent leur capacité à réguler les échanges d'eau. La réplication des tissus cutanés devient moins efficace et peut même engendrer des altérations multiplicatives. Tous ces phénomènes se traduisent, entre autres, de façon visible, par une perte de la souplesse et de l'éclat de la peau, par une desquamation de la peau et par l'apparition de rides.

La peau subit, plus que tout autre tissu, des agressions externes, physiques, chimiques et bactériologiques contre les méfaits desquelles la composition de l'invention se propose de lutter.

Les différents types de molécules présentes, de taille inégales, de durée et de cibles d'action différentes confèrent à la composition selon l'invention ses capacités multifonctionnelles uniques et ses propriétés remarquables et inattendues au vue de l'art antérieur.

Ces molécules existent aussi, selon une répartition différente, dans d'autres fruits, d'autres végétaux et dans certaines graines, mais c'est sous une forme plus concentrée et plus active qu'elles apparaissent dans la composition selon l'invention.

De façon surprenante, la composition de l'invention présente un effet à la fois dans la régulation de la perméabilité de la peau, dans la reconstitution du film hydrolipidique et dans la stabilisation des radicaux libres.

De même, de façon inattendue, la composition de l'invention inhibe la protéolyse de la hyaluronidase, comme le démontre les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention, rapportés dans la partie expérimentale ci-après (exemple n° 7).

Un objet de la présente invention est donc l'utilisation de la composition de l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les pathologies liées à un excès de hyaluronidases.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation de la composition de l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir, retarder ou réparer les manifestations du vieillissement, par l'intermédiaire d'une action sur les hyaluronidases.

La composition selon l'invention agit également en tant que "piégeur" de radicaux oxygénés libres en inhibant la formation de l'ion superoxyde, produit de la réduction monovalente de l'oxygène.

Un objet de la présente invention est donc l'utilisation de la composition de l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les pathologies liées aux radicaux libres.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation de la composition de l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir, retarder ou réparer les manifestations du vieillissement liées aux radicaux libres.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation de la composition de l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir, retarder ou réparer les manifestations du vieillissement en favorisant la reconstitution du film hydrolipidique de surface.

Les tests effectués dans le cadre de la présente invention, et rapportés dans la partie expérimentale ci-après, montrent une diminution remarquable de la surface de l'ombre portée allant jusqu'à 55% sur les sites traitées, et une amélioration très significative de la complexité, de la profondeur et du volume de la ride traitée avec la composition de l'invention.

Un objet de la présente invention est donc l'utilisation de la composition de l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir, retarder, atténuer, voire éliminer les rides et / ou les ridules.

Les tests de screening relatifs à l'activité anti-élastase de la composition selon l'invention ont montré un effet synergique sur l'inhibition de l'activité élastase. En effet, la dose efficace, correspondant à la quantité d'extrait en mg dans 1 ml de milieu réactionnel, qui est nécessaire à une inhibition de 50% de l'activité élastase est de l'ordre de 18 mg/ml pour la composition selon l'invention, alors qu'elle est de 23 mg/ml pour un extrait de Pin, et de 47 mg/ml pour un extrait de Cassis.

Les tests réalisés dans le cadre de la présente invention ont également montré que la composition selon l'invention inhibe la protéolyse enzymatique du collagène.

Un objet de la présente invention est donc l'utilisation de la composition selon l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à

prévenir ou à traiter les pathologies liées à une dégradation enzymatique du collagène.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation de la composition selon l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir, retarder ou réparer les manifestations du vieillissement liées à une protéolyse enzymatique du collagène.

La composition de l'invention joue aussi un rôle anti-inflammatoire, anti-histaminique, il améliore la circulation veineuse et semble avoir une action bénéfique sur le psoriasis.

Un objet de la présente invention est donc l'utilisation de la composition de l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter le psoriasis.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation de la composition de l'invention pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les inflammations.

L'invention se rapporte à une composition caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange d'extraits de Pin et de Cassis.

L'invention se rapporte plus particulièrement à une composition caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange d'extraits végétaux issus d'un mélange d'écorces de Pin et de feuilles de Cassis.

L'invention se rapporte également au procédé mis en œuvre pour obtenir la composition de l'invention. Il s'agit d'un procédé d'extraction hydroalcoolique qui consiste à broyer le Pin et le Cassis, à mettre en présence le broyat obtenu avec le solvant, l'extraction se faisant de préférence à température ambiante, avec une agitation mécanique lente et brassante, et à l'obscurité. Suit une étape d'égouttage, par exemple sur un tamis, puis une étape de filtration, par exemple sur filtre papier.

L'extrait récupéré, liquide limpide, brun orangé, est une composition selon l'invention. Il présente une densité à 20°C environ égale à $1 \pm 0,05$ et un pH de l'ordre de $5 \pm 0,5$.

Selon un mode préféré de l'invention, le mélange de plantes est constitué de 60% à 90% d'écorces de Pin et la quantité suffisante pour 100%, soit 40% à 10% de feuilles de Cassis, et de préférence de 75% d'écorces de Pin et 25% de feuilles de Cassis en poids par rapport au poids total de plante.

Selon un mode préféré de l'invention, le mélange de plante est plus particulièrement de 75% d'écorces de Pin sylvestre et 25% de feuilles de Cassis Noir de Bourgogne.

5 Selon un mode préféré de l'invention, le solvant utilisé est un mélange d'éthanol 96,3° et d'eau désionisée dans un rapport de 60/40 (v/v).

L'invention se rapporte également à une composition constituée d'un mélange d'extraits issus du procédé d'extraction par un solvant constitué d'éthanol et d'eau.

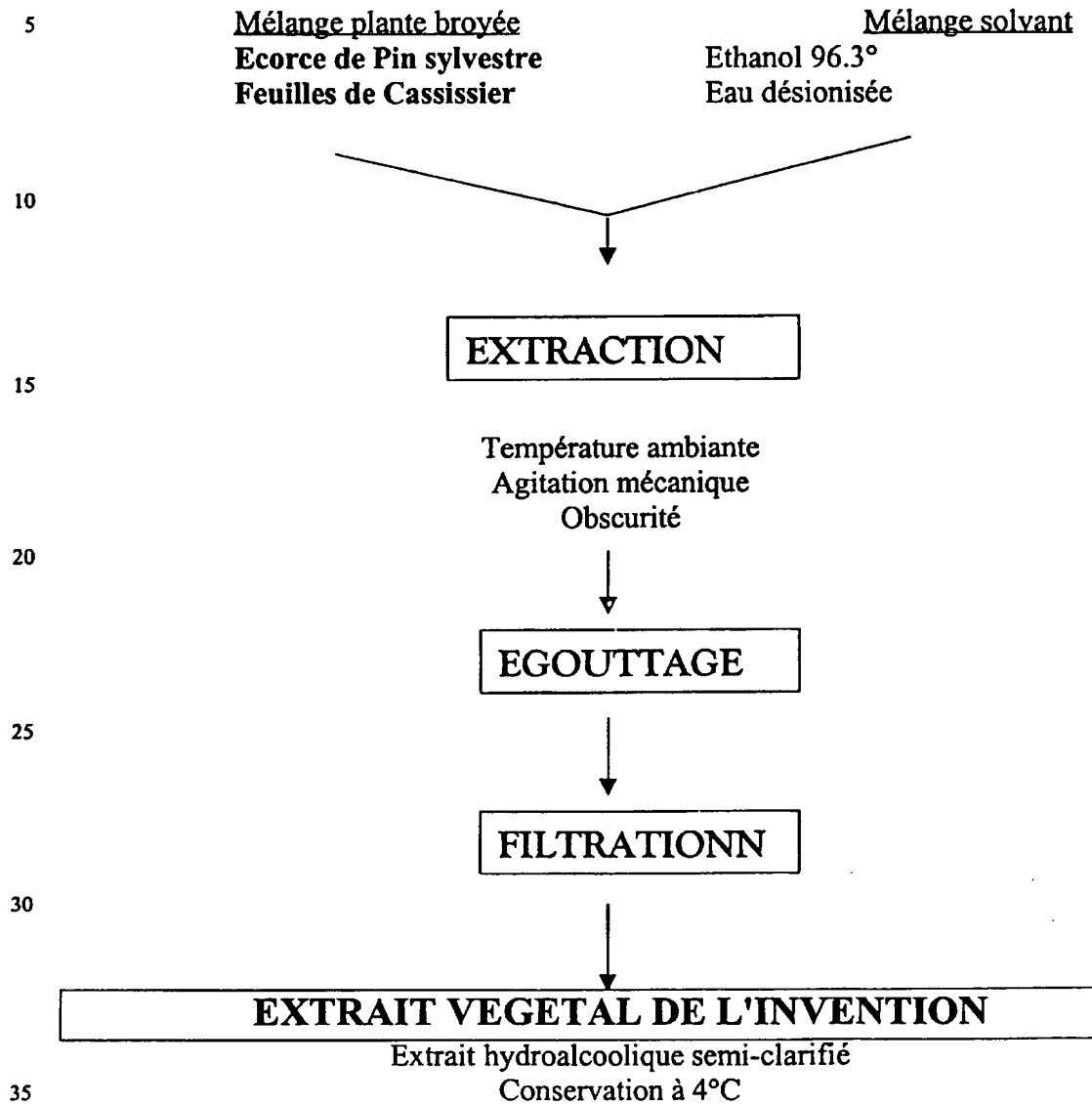
Selon un mode préféré de l'invention, le solvant est constitué d'éthanol et d'eau dans un rapport 60/40.

10 L'invention a également pour objet toute composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant une composition selon l'invention.

Les doses d'utilisation d'une composition selon l'invention dans une formulation cosmétique ou pharmaceutique peuvent varier en fonction de la propriété recherchée, et peuvent de préférence être comprise entre 1 et 10% en poids par
15 rapport au poids total de ladite formulation cosmétique ou pharmaceutique.

L'invention a encore pour objet une composition cosmétique ou pharmaceutique se présentant sous forme de crèmes, pommades, gels, solutions ou émulsions.

La figure et les exemples ci-après illustrent l'invention sans en limiter la portée.

Exemple n° 1 : Procédé d'extraction.

Exemple n° 2 : Test de screening interne : test anti-élastase.

Principe du test :

L'évaluation de l'activité anti-élastase de la composition selon l'invention est
5 basée sur le modèle N-succinyl-Ala-Ala-Ala p-nitroaniline (SANA) / élastase.
L'élastase est responsable de la dégradation de l'élastine ce qui induit une
diminution de l'élasticité et de la souplesse de la peau.

Ce test utilise un substrat synthétique dégradé par l'élastase. Ce substrat
incolore donne des produits de dégradation de couleur jaune après action
10 enzymatique. L'ajout au milieu réactionnel d'un extrait présentant des propriétés anti-
élastase va induire une diminution de la dégradation du SANA et donc une variation
de densité optique (DO), mesurée à 390 nm.

Résultats :

15 La composition de l'invention inhibe plus de 75 % de l'activité élastase pour un
test réalisé à 0.5% de matière sèche.

CI 50 Anti-élastase :

- Matière efficace (quantité de matière sèche de l'extrait) : 0,017 - 0,025%
- 20 - Dose efficace (quantité d'extrait) : 14,5 - 21,7 mg/ml

Soit un pourcentage de produit assurant une inhibition de 50% de l'activité anti-
élastase compris entre 1,50 % et 2,20%.

Ainsi, une formulation à 2% assure une inhibition de l'activité anti-élastase de
plus de 50%.

25

Exemple n° 3 : Test de screening interne : test anti-oxydant

Principe du test :

L'évaluation de l'activité anti-oxydante de la composition de l'invention est
30 basée sur le modèle Xanthine / Xanthine oxydase. La xanthine sous l'action de la
xanthine oxydase génère un anion superoxyde et de l'acide urique.

La réaction est révélée par le cytochrome C (brun-orangé sous forme oxydée
et rose sous forme réduite) qui est réduit par l'attaque radicalaire de l'anion
superoxyde. L'ajout au milieu réactionnel d'un extrait présentant des propriétés anti-

radicalaires va induire une diminution de la quantité de cytochrome C réduite, soit une variation de DO (mesure effectuée à 550 nm).

Ce test permet de quantifier la capacité de la composition de l'invention à inhiber les réactions d'oxydation. Il sera complété par le test à la DPPH qui suit.

5

Résultats :

La composition de l'invention inhibe plus de 75% de l'activité xanthine / xanthine oxydase pour un test réalisé à 0.025% de matière sèche.

10 CI 50 Xanthine oxydase :

- Matière efficace (quantité de matière sèche de l'extrait) : $1,7 \cdot 10^{-3}$ - $2,5 \cdot 10^{-3}$ %
- Dose efficace (quantité d'extrait) : 1,45 – 2,17 mg/ml

Soit un pourcentage de produit assurant une inhibition de 50% des réactions oxydatives compris entre 1,50 % et 2,20%.

15 Ainsi, une formulation à 2% assure une inhibition des réactions oxydatives de plus de 50%.

Exemple n° 4 : Test de screening interne : test à la DPPH :

20 Principe du test :

L'activité anti oxydante ou anti-radicalaire peut être mise en évidence en montrant la capacité de la composition de l'invention à piéger les radicaux libres de la DPPH (DiPhényl Picryl Hydrazyl) qui entraîne une décoloration de la solution d'origine.

25 L'effet piégeur du radical libre DPPH par la composition de l'invention est exprimé en pourcentage de la diminution de la coloration d'origine. Les mesures s'effectuent à 520 nm.

Cette étude complète celle du test xanthine / xanthine oxydase et confirme dans le cas présent l'activité anti-âge de la composition de l'invention.

30

Résultats :

La composition selon l'invention inhibe plus de 90% de l'activité anti-radicalaire, pour un test réalisé à 0.5% de matière sèche.

Les trois exemples qui suivent portent sur des tests in vitro réalisés sur culture cellulaire afin de déterminer les propriétés cosmétiques exactes de la composition de l'invention.

5 Exemple n° 5 : Test de in vitro : Test anti-élastase.

Principe du test :

Il permet la mise en évidence du pouvoir inhibiteur direct de la composition de l'invention vis à vis de l'activité élastase de fibroblastes de derme humains. Cette
10 évaluation permet une comparaison de l'activité élastase des fibroblastes après traitement pendant 72H des cellules à différentes concentrations de la composition de l'invention.

Pour chaque concentration, les résultats sont exprimés en variation de densité optique par minute calculé à partir des droites de régression à 405 nm. Une unité
15 élastase étant définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole de 4-nitroanilide/min. L'activité élastase est alors exprimée en mU/mg de protéines.

Cinq concentrations ont été testées :

- 1 mg/ml
- 5 mg/ml
- 20 - 10 mg/ml
- 25 mg/ml
- 50 mg/ml

Des témoins éthanol sont réalisés simultanément et aux mêmes concentrations.

25

Résultats :

La composition de l'invention est capable d'inhiber, de manière dose dépendante, l'activité catalytique de l'élastase, par effet direct à des doses de 25 mg/ml soit 2.5% (27% d'inhibition) et 50 mg/ml soit 5.0% (50% d'inhibition).

30

Exemple n° 6 : Test de in vitro : Test anti collagénase.Principe du test :

Il s'agit de mettre en évidence le pouvoir inhibiteur de la composition de l'invention vis à vis de l'activité collagénase de fibroblastes de derme humain. Cette évaluation permet la comparaison de l'activité collagénase des fibroblastes après traitement des cellules pendant 72 H par différentes concentrations de la composition de l'invention.

Pour chaque concentration, la moyenne des densités optiques obtenues à 630 nm (dosage de la collagénase) est calculée. Les concentrations de collagénase (ng/ml) sont ensuite corrigées en fonction du taux de protéines cellulaires (µg/ml). L'activité collagénase est exprimée en ng de collagénase libérée par µg de protéines cellulaires.

5 concentrations ont été testées :

0.1 mg/ml

0.5 mg/ml

1 mg/ml

5 mg/ml

10 mg/ml

Des témoins éthanol sont réalisés simultanément et aux mêmes concentrations.

Résultats :

L'activité anti-collagénase de la composition de l'invention est dose dépendante jusqu'à 5 mg/ml soit 51.3%. Cette concentration est capable de réduire de 51% l'activité collagénase des cellules.

N°	Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inhibition
1	0.1	6.7%
2	0.5	29.2%
3	1	41.2%
4	5	51.3%
5	10	44.4%

Exemple n° 7 : Test de in vitro : Test anti hyaluronidase.

Principe du test :

Il permet la mise en évidence du pouvoir inhibiteur de la composition de
5 l'invention vis à vis de l'activité hyaluronidase de cellules épithéliales MDCK.

Cette évaluation permet la comparaison de l'activité hyaluronidase de cellules
épithéliales MDCK après un traitement de 72 h en présence de différentes
concentrations de la composition de l'invention.

L'activité est appréciée par le taux de libération des groupements N-acétyl
10 glucosamine provenant de la dégradation de l'acide hyaluronique. La mesure des
taux de N-acétyl glucosamine (GNAc) présents dans les différentes concentrations
est réalisée au moyen d'une réaction colorimétrique avec du 4- diméthyl
aminobenzaldéhyde à 585nm.

Une unité hyaluronidase étant définie comme la quantité d'enzyme qui libère
15 1µmole de N-acétylglucosamine par min , la concentration catalytique exprimée en
unité hyaluronidase par mg de protéines cellulaires (U/mg prot.) est calculée pour
chaque concentration.

5 concentrations ont été testées :

0.1 mg/ml
20 0.5 mg/ml
1,1 mg/ml
5.0 mg/ml
10.0 mg/ml

Des témoins éthanol sont réalisés comparativement et aux même
25 concentrations.

Résultats :

Cette étude a montré que la composition de l'invention est capable de réduire
l'activité hyaluronidase des cellules. Cet effet est maximum pour une concentration
30 de 5 mg/ml soit 0.5%. L'absence d'effet inhibiteur direct sur l'enzyme isolée laisse
envisager une activité de la composition de l'invention au niveau de la synthèse de
l'enzyme plutôt qu'une activité inhibitrice de l'activité catalytique de la hyaluronidase.

Exemple n° 8 : Tests in vivo : Evaluation du potentiel irritant primaire oculaire et cutané.

a) Irritation cutanée

5

L'étude a été réalisée sur un gel contenant 10% de la composition de l'invention, appliqué tel quel sous pansement occlusif, pendant 48 H sur le dos de 10 sujets souffrants d'une pathologie supposée d'origine allergique.

10 Examen et évaluation macroscopique des réactions :

Une lecture est pratiquée 30 minutes à 1 H après l'enlèvement des pansements. En cas de doute une seconde lecture est pratiquée 24 ou 48 H plus tard.

Six paramètres pouvant être observés conjointement ou séparément, sont recherchés et pondérés selon une échelle arbitraire à 5 niveaux (0 à 4)

15

✓ Présence d'un érythème

✓ Présence d'un oedème

✓ Présence d'une vésicule

✓ Sécheresse cutanée

20

✓ Rugosité cutanée

✓ Réflectivité de la peau

La tolérance au produit est évaluée par le médecin dermatologue, en fonction des résultats observés, de leur intensité, et de leur reproductibilité d'un sujet à l'autre.

25

Résultats :

4 sujets sur 10 ont réagi au produit, pour 2 d'entre eux la réaction allergique enregistrée est vraisemblablement liée à la présence de traces d'huile essentielle provenant de la composition de l'invention.

30

Sur le plan cutané, les réactions enregistrées ne sont, à priori, pas liées à un fort potentiel irritant.

b) Irritation oculaire :

Le potentiel irritant oculaire a été évalué par deux méthodes alternatives complémentaires :

- 5 ✓ L'étude de cytotoxicité sur fibroblastes.
- ✓ L'étude sur membrane chorio-allantoïdienne d'œufs de poule (HET-CAM).

Ces tests sont proposés comme une alternative au test de DRAIZE chez le lapin pour les produits cosmétiques et d'hygiène.

- 10 L'étude a été réalisée à partir d'une formulation contenant 10% de la composition de l'invention, appliqué tel quel sur la membrane Chorio-allantoïdienne, et ramolli au bain marie avant l'étude de cytotoxicité sur fibroblastes.

Test sur fibroblastes de lapin :

- 15 Les fibroblastes de cornée de lapin (*lignée SIRC*) sont cultivés dans du milieu de culture complet additionné de sérum de veau fœtal (10%) et d'antibiotiques. La suspension cellulaire est ensuite répartie dans les puits d'une microplaque (96 puits). Le produit est ensuite ajouté à la suspension cellulaire et mis en contact pendant 30 minutes, 1 heure et 4 heures.

- 20 La révélation se fait par colorimétrie (Réaction au MTT). A partir des densités optiques (DO) mesurées pour chaque temps de contact, un pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule :

$$\% (t) = [(DO \text{ témoin} - DO \text{ échantillon}) / DO \text{ témoin}] \times 100$$

- 25 A partir de ce pourcentage, un indice moyen de cytotoxicité (IMC) est calculé selon la formule :

$$IMC = (\% 30 \text{ minutes} + 0.5\% 1 \text{ heure} + 0.125 \% 4 \text{ heures}) / 3$$

- 30 Un indice d'irritation équivalent (IO éq) est alors calculé, ce qui permet de classer le produit selon le barème du test de DRAIZE présenté au journal officiel de la république Française du 10 Juillet 1992.

$$IO \text{ éq.} = 6.5$$

L'indice IO éq. obtenu permet de classer notre produit formulé comme faiblement irritant.

Test HET-CAM :

5

Ce test est réalisé sur 2x3 œufs de poule White Leghorn embryonnés pesant entre 50 et 60 g., placés dans un incubateur pendant 10 jours dans des conditions strictes de température et d'humidité.

Cet examen réalisé avec une lampe loupe, consiste à évaluer au niveau de la membrane l'apparition au bout de 30 secondes, 2 et 5 minutes, des phénomènes suivant :

Injection

Hémorragie

Coagulation

Les réactions observées sont cotées selon des échelles en fonction de leur temps d'apparition. Les cotations obtenues pour les trois phénomènes sont additionnées et représentent un indice d'irritation individuel. La moyenne des indices individuels permet d'obtenir un indice d'irritation (IP-MCA).

$$IP-MCA = 0.3$$

20

IP-MCA	Classe
0 à 0.9	Non irritant
1 à 4.9	Faiblement irritant
5 à 8.9	Modérément irritant
9 à 21	Très irritant

Résultat de l'évaluation du potentiel irritant :

25

IP-MCA = 0.3

IO éq = 6.5

Conclusion : produit faiblement irritant.

Exemple n° 8 : Tests in vivo : Etude de l'effet anti-ride.

Le but principal de l'étude était de mettre en évidence l'efficacité anti-rides de la composition de l'invention dans une formule de « base » au niveau de la patte d'oie.

Cette étude a été menée contre placebo, sur 12 volontaires de sexe féminin.

Les empreintes ont été effectuées au niveau de chaque patte d'oie à T0, avant tout traitement, puis à T28, après 28 jours d'application. Deux méthodes d'analyse ont été retenues : analyse de l'ombre portée et analyse tridimensionnelle des rides.

Les produits ont été appliqués tels quels au niveau du pli du coude, pendant une semaine, afin de vérifier leur innocuité.

a) Analyse de l'ombre portée :

L'analyse des empreintes a révélé une amélioration du site traité par rapport au site placebo par 8 sujets sur 11 retenus pour l'exploitation, avec une diminution de la surface de l'ombre portée allant jusqu'à 55% pour l'un des sujets.

b) Analyse tridimensionnelle :

Sur chaque paire d'empreinte (avant et après), et au niveau des deux sites (site traité et placebo), une zone de 5 mm² a été repérée et analysée.

Trois paramètres ont été retenus :

complexité de la ride ou impact visuel.

Il correspond au supplément d'aire développé par rapport à l'aire horizontale ; il est exprimé en pourcentage.

Profondeur de la ride.

Elle correspond à la moyenne des profondeurs du fond du sillon ; elle est exprimée en mm.

Volume de la ride.

Il est exprimé en mm³.

L'analyse de ces trois paramètres a révélé une amélioration globale au niveau du site traité par rapport au site placebo pour 7 sujets sur 10.

Les coupes de la figure 1 démontrent très clairement l'efficacité de la composition de l'invention.

5 Cf. Figure 1.

c). Evaluation subjective par les sujets de l'efficacité du produit.

Elle a été réalisée à l'aide d'échelles analogiques.

10 Les sujets ont évalué l'intensité des rides et des ridules avant application des produits et à l'issue des quatre semaines d'application, au niveau du site traité et du site témoin.

Six sujets sur douze ont trouvé une différence en faveur du produit à l'étude par rapport au placebo concernant la diminution des rides, et quatre sur douze
15 concernant la diminution des ridules.

d) Qualités cosmétiques des produits

Les sujets ont évalué les qualités cosmétiques de la composition de l'invention
20 testée selon neuf paramètres :

- couleur,
- parfum,
- texture,
- facilité d'application,
- 25 - pénétration du produit,
- douceur cutanée,
- produit dans son ensemble,
- utilisation du produit,
- achat du produit.

30 Il ressort de cette étude que sept sujets sur douze souhaiteraient continuer l'utilisation de la composition selon l'invention et que six d'entre eux l'achèteraient.

Remarque : Il ne faut pas oublier que la formulation utilisée pour ces tests est basique, afin de vérifier l'efficacité de la composition de l'invention et non celle d'un

ensemble d'excipients qui amélioreront la qualité cosmétique du produit fini (texture, pénétration...).

e) Evaluation de la tolérance :

5

Aucun signe d'intolérance n'a été enregistré à l'issue des quatre semaines d'application dans les conditions normales d'emploi.

- Appréciation de la tolérance par les sujets :

- 10 > bonne pour onze sujets
> picotements fugaces pour un sujet.

- Appréciation de la tolérance par l'investigateur :

- > bonne pour tous les sujets.

15 **Exemple n° 9 : Exemple de formulation.**

	Apifil	12,0
	Huile de jojoba	5,0
	Huile d'amande douce	3,0
20	Phenonip	0,5
	Antiox	0,35
	Carbopol ultrez	0,20
	NaOH (10%)	0,40
	Composition selon l'invention	5,0
25	Parfum qsp	100
	Eau qsp	100

Exemple n° 10 : Une composition selon l'invention.

- 30 En suivant un procédé selon l'invention, on obtient une composition de l'invention présentant les caractéristiques suivantes :

Composition

Mélange d'extraits éthanoliques d'écorces de Pin et de feuilles de Cassis.

	<u>Dénomination INCI</u>	Eau, Alcool, extrait de Pin (pinus sylvestris), extrait de Cassis (ribes nigrum).
	<u>Solvant de l'extrait</u>	Ethanol-eau (60/40)
5	<u>Caractères organoleptiques</u>	Liquide limpide, brun orangé, Odeur caractéristique.
	<u>Densité à 20°C</u>	1.00 ± 0.05
10	<u>pH</u>	5.0 ± 0.5
	<u>Solubilités</u>	Soluble dans l'eau et les alcools dilués. Insoluble dans les solvants organiques et les Huiles.
15		
	<u>Identification A</u> (réaction colorimétrique)	Ajouter 1 ml de HCL à 25% et 150 mg de tournures de magnésium à 5 ml de la composition de l'invention. Il apparaît une coloration jaune orangé attestant de la présence de flavonoïdes ;
20		
	<u>Identification B</u> (CCM des flavonoïdes)	Mettre 2 ml de la composition à l'étuve à 100° jusqu'à évaporation complète du solvant. Reprendre le résidu par 1 ml d'éthanol 96°. Dépôt de 10 µl. Solvant de migration
25		
		Acétate d'éthyle 100
		Acide formique 10
30		Acide acétique 10
		Eau 27

Migration de 10 cm

Révélateur : Diphénylboryloxyéthylamine et
Polyoxyéthylèneglycol 4000.

5

Lecture visible et UV.

Rf	Couleur	
	Visible	U.V
0,78	Jaune	Jaune
0,68	Orange	Orange
0,58	Rose	Rose
0,55		Bleue
0,43	Orange	Orange
0,38		Bleue
0,31	Rose	Rose
0,27		Vert
0,18		Rose

Matière sèche

1.00 % \pm 0.1

10 **Titre alcoolique**

60° \pm 5.0

Dosage des polyphénols

7.0 % \pm 1.0

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

R. PARIS et H. MOYSE

Matières médicales

5 Masson, Paris, Tome II, 1981.

L. BREMNESS

Les plantes aromatiques et médicinales

Bordas nature, Paris, 1996.

10

J. BRUNETON

Pharmacognosie

Lavoisier, Paris, 1993.

15 **L. BEZANGER-BEAUQUESNE L. – M. PINKAS – M. TORCK**

Les plantes dans la thérapeutique moderne

Maloine, Paris, 1975.

A. MELISSOPOULOS et C. LEVACHER

20 La peau – Structure et physiologie

Tec et Doc Lavoisier, Paris, 1998.

M. PRUNERIAS

Précis de cosmétologie dermatologique

25 Masson, Paris, 1981.

J. ASSERIN et P. HUMBERT

Propriétés viscoélastiques de la peau.

Cosmétologie, 16, Octobre/Décembre 1997.

30

AM. ORRECHIONI

Produits « anti-âge » : actifs et formes galéniques

Cosmétologie, 18, Avril/Juin 1998.

REVENDECATIONS.

- 1) Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange d'extraits de Pin
5 et de Cassis.
- 2) Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'extrait de Pin est
un extrait d'écorces de Pin et l'extrait de Cassie est un extrait de feuilles de
Cassis.
- 10 3) Composition selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que les
extraits sont des extraits éthanliques, et en ce qu'elle se présente sous la forme
d'un liquide limpide de couleur brun orangé, dont le pH est d'environ $5 \pm 0,5$ et
dont la densité à 20°C est d'environ $1 \pm 0,05$.
- 15 4) Composition selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la
proportion d'écorces de Pin est d'environ 60 à 90%, de préférence de 75%, et
celle de feuilles de Cassis est d'environ 40 à 10%, de préférence 25% en poids
par rapport au poids total de plante.
- 20 5) Composition selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'elle
présente une activité anti-hyaluronidase.
- 6) Composition selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisée en ce qu'elle
25 présente l'une au moins des activités suivantes :
- anti-collagénase,
 - anti-élastase,
 - anti-oxydante,
 - antiradicalaire.
- 30 7) Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend une composition
selon l'une des revendications 1 à 6, en association avec des excipients
physiologiquement acceptables.

- 8) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une composition selon l'une des revendications 1 à 6, en association avec des excipients physiologiquement acceptables.
- 5 9) Composition cosmétique ou pharmaceutique selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce que la proportion de composition selon l'une des revendications 1 à 6 est d'environ 1% à environ 10% en poids par rapport au poids total de ladite composition cosmétique ou pharmaceutique.
- 10 10) Composition cosmétique ou pharmaceutique selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de crèmes, pommades, gels, solutions ou émulsions.
- 15 11) Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 6 pour la préparation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques destinées à l'un au moins des effets suivants :
- prévenir, retarder ou traiter les pathologies ou les manifestations du vieillissement de la peau, telles que celles liées aux hyaluronidases, et / ou aux radicaux libres,
 - 20 - favoriser la reconstitution du film hydrolipidique de surface,
 - prévenir, retarder, atténuer, ou éliminer les rides et / ou ridules,
 - prévenir, retarder ou traiter les effets des rayonnements solaires,
 - la prévention ou le traitement de l'une au moins des pathologies suivantes :
 - 25 - manifestations ou pathologies cutanées inflammatoires ou allergiques,
 - psoriasis,
 - troubles de la circulation veineuse.
- 30 12) Procédé d'obtention d'un extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comprend :
- une étape de broyage du mélange d'écorces de Pin et de feuilles de cassis,

- suivie d'une étape d'extraction du broyat par un solvant constitué d'éthanol à 96,3° et d'eau désionisée, à température ambiante, sous agitation mécanique lente et à l'obscurité,
- suivie d' une étape d'égouttage,
- 5 - et d'une étape de filtration.

13) Méthode de traitement esthétique caractérisée en ce qu'elle comprend l'application topique d'une composition cosmétique selon la revendication 7.

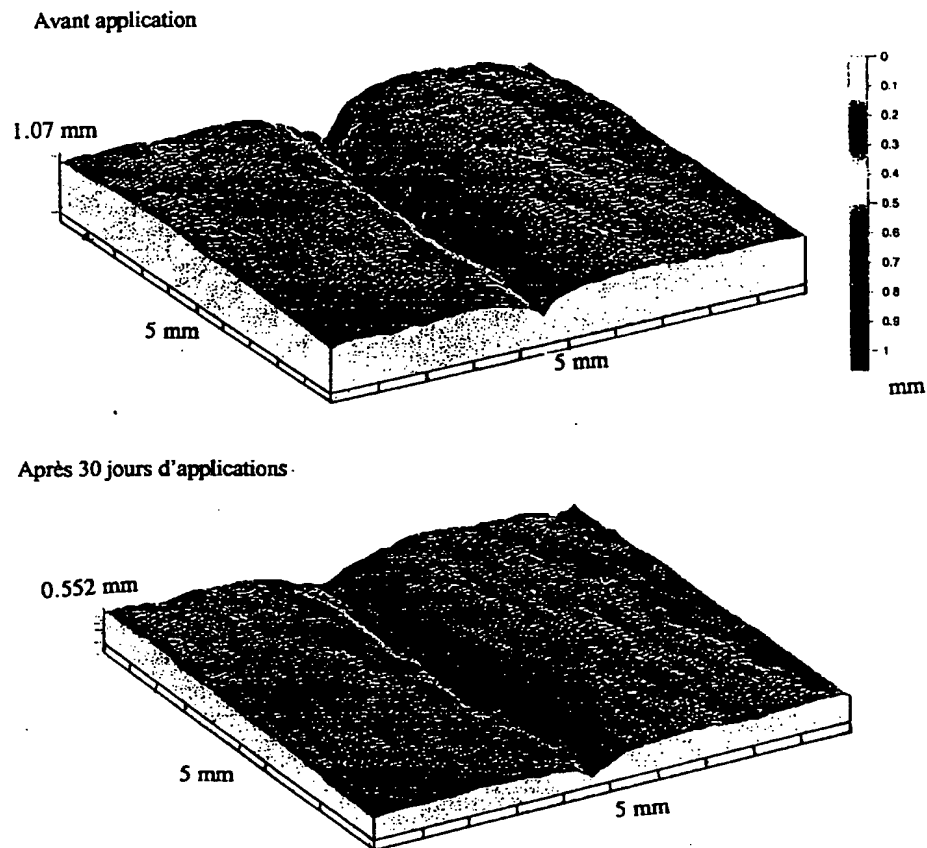


Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2792203
N° d'enregistrement
national

FA 573114
FR 9904910

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	M. JONADET ET AL.: "ANTHOCYANOSIDES EXTRAITS DE VITIS VINIFERA, DE VACCINIUM MYRTILLUS ET DE PINUS MARITIMUS." JOURNAL DE PHARMACIE DE BELGIQUE., vol. 38, no. 1, janvier 1983 (1983-01) - février 1983 (1983-02), pages 41-46, XP000857777 MASSON, PARIS., FR ISSN: 0047-2166 * le document en entier *	1,6
X	M. JONADET ET AL.: "FLAVONOIDES EXTRAITS DE RIBES NIGRUM L. ET D'ALCHEMILLA VULGARIS L." JOURNAL DE PHARMACOLOGIE., vol. 17, no. 1, janvier 1986 (1986-01) - mars 1986 (1986-03), pages 21-27, XP000857776 MASSON, PARIS., FR ISSN: 0021-793X * le document en entier *	1,6
A,D	WO 98 51291 A (MICHIELS CARINE ;REMACLE JOSE (BE)) 19 novembre 1998 (1998-11-19)	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 janvier 2000		Rempp, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		